

**BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREN UND
BIOGENEN AMINEN AUS PHYSIOLOGISCHEN MEDIEN
IM PICOMOLAREN BEREICH**

BERNHARD MICHAEL KEMPTER

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. G. ten Bruggencate

Prof. Dr. E. Gerlach

Prof. Dr. K. Thureau

Bestimmung von Aminosäuren und biogenen Aminen

aus physiologischen Medien

im picomolaren Bereich

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Bernhard Michael Kempter

aus

Augsburg

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G. ten Bruggencate
Mitberichterstatter:
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 6.5.1986

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	5
-------------	---

EINLEITUNG	7
------------	---

MATERIAL und METHODEN	11
-----------------------	----

1. Chemikalien	11
2. DABS-Cl Derivatisierung und Chromatographie-System	11
3. OPA Derivatisierung und Chromatographie-System	12
4. Bestimmung der Biogenen Amine	13
a) Reinigung des Aluminiumoxids	13
b) Anreicherung der Biogenen Amine	13
c) Analyse der Biogenen Amine	13
d) Behandlung biologischer Proben	14

ERGEBNISSE	15
------------	----

1. Aminosäureanalyse mit DABS-Cl Derivatisierung	15
a) Versuche mit Standard Lösungen	15
b) Versuche mit physiologischen Medien	17
c) Versuche zur Trennung von Aminosäuren und Salzen	19
d) Versuche zur Reinigung von DABS-Cl	20

2. Aminosäureanalyse mit OPA Derivatisierung	21
--	----

3. Die Analyse von biogenen Aminen	26
a) Anmerkungen zur Methodik	26
b) Gehalt von Biogenen Aminen im zirkumoesophagalen Ganglion von Planorbis corneus	27
c) Freisetzung von Dopamin aus einzelnen Ganglien von Planorbis und Einflüsse von K^+ und Blockern der Dopaminaufnahme.	30
DISKUSSION	34
1. Praktische Verwendbarkeit der Aminosäureanalyse mit DABS-Cl bzw. OPA Derivatisierung	34
2. Zu den Katecholaminen im zirkumoesophagalen Ganglion von Planorbis und deren Freisetzung	36
ZUSAMMENFASSUNG	39
LITERATUR	41

ABKÜRZUNGEN

AD	Adrenalin
DA	Dopamin
DABS-Cl	4-N,N-Dimethylaminoazobenzolsulfonsäurechlorid
DHBA	3,4-Dihydroxybenzaldehyd
ECD	Elektrochemische Detektion
GDC	Giant Dopamine Containing Neuron
HPLC	Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
NA	Noradrenalin
OPA	ortho-Phthalaldehyd
TCA	Trichloressigsäure
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
ZNS	Zentralnervensystem

Drei- und Ein-Buchstabensymbole der Aminosäuren

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin

Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin
β -Ala	β -A	β -Alanin
GABA	Ga	γ -amino-Buttersäure
Tau	Ta	Taurin

E I N L E I T U N G

Die Hirnforschung ist weltweit einer der Schwerpunkte der Biowissenschaften. Ein Teilaspekt der Neurobiologie, dem zunehmend größeres Interesse zuteil wird, betrifft den Zusammenhang zwischen der elektrischen Aktivität der Neurone und den zellulären biochemischen Abläufen. Insbesondere die Verknüpfung von neuronaler Aktivität und Transmitterfreisetzung ist seit Jahren ein aktuelles Thema.

Die an der chemischen Weiterleitung von Information im Nervensystem beteiligten Transmitter sind im Wesentlichen kleine Moleküle mit einem Molekulargewicht von ein bis wenigen hundert Dalton. Sie gruppieren sich in : a) Aminosäuren, wie sie auch als Bausteine von Proteinen zu finden sind, oder analogen Verbindungen wie z.B. γ -amino-Buttersäure (GABA) oder Taurin; b) den sogenannten biogenen Aminen, wie Adrenalin, Noradrenalin oder Dopamin, c) Acetylcholin und d) Peptide, wie z.B. die in den letzten Jahren intensiv erforschten Endorphine.

Im Laufe der Zeit wurden viele Wege beschritten, diese Moleküle einer quantitativen Analyse aus biologischem Material zugänglich zu machen. Die am weitesten verbreitete Methode ist die Verwendung von radioaktiv markierten Transmittern oder ihren Vorstufen, mit denen ein zu untersuchendes Gewebe zuerst inkubiert wird, um dann die Ausschüttung von Radioaktivität zu messen. Als Beispiele möchte ich auf Oja (1981) , Fonnum (1982) und Taxt (1984) verweisen. In neuerer Zeit wurden allerdings Zweifel angemeldet, ob mit dieser Methode die tatsächlich freigesetzte Menge an Transmitter gemessen wird (Ferkany & Coyle, 1983). Transmitter direkt zu messen, ist also ein wichtiges Problem.

Eine elegante Methode ist die Bestimmung mittels spezifischer Antikörper durch Radio-Immuno-Assay (RIA); sie ist jedoch nur bei größeren Molekülen, den Peptiden, möglich. Ein weiterer

Weg ist die mikroenzymatische Bestimmung, wobei jedoch nur Substanzen bestimmt werden können, für die ein Enzym-Assay möglich ist, wie z.B. für Asparagin und Glutamin (Nadler et al., 1979; Nitsch & Okada, 1979) oder Acetylcholin (Israel & Lesbats, 1981, 1982). Bei den meisten Aminosäuren und biogenen Aminen muß daher ein anderer Analysenweg gegangen werden.

Aminosäuren sind amphotere Moleküle, die in der Natur frei, konjugiert mit einer Vielzahl anderer Substanzen oder als Bausteine von Proteinen und Peptiden in Erscheinung treten. Die gruppentypische Formel ist in Abb. 1 gezeigt, wobei sich die einzelnen Aminosäuren nur in der Seitenkette R unterscheiden (mit Ausnahme von Prolin).

Nur 20 verschiedene Aminosäuren werden von der Natur in der Proteinbiosynthese verwendet und auch nur für diese 20 Aminosäuren sind Codons in der DNA vorhanden, aber eine viel größere Anzahl verschiedener Aminosäuren werden außerhalb von Proteinen und Peptiden gefunden, wozu auch einige Neurotransmitter zählen (Wold, 1981).

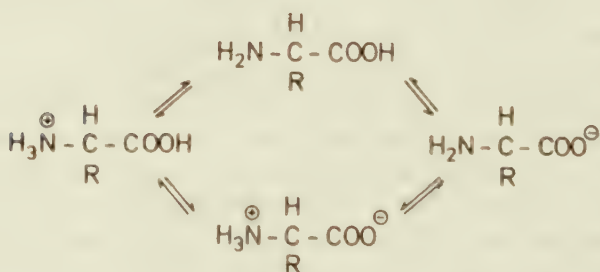


Abb. 1 Gruppentypische Formel der Aminosäuren und ihrer Ionenformen.

Eine Vielzahl physikochemischer Trenn- und Nachweismethoden

wurde eingesetzt, um das komplexe Problem der Aminosäureanalyse zu lösen. Elementar ist dafür die Detektion, da die Aminosäuren zum großen Teil nur sehr schwach im UV-Bereich absorbieren. Deswegen wird zur Derivatisierung, d.h. zur chemischen Kopplung eines Chromophors an eine funktionelle Gruppe, gegriffen, um eine Absorption oder Fluoreszenz zu erzeugen. Einen Markstein stellten die Arbeiten von Spackmann, Stein und Moore (1958) dar, in denen erstmals eine automatisierte quantitative Erfassung aller physiologischen Aminosäuren beschrieben wurde. Eine Analyse benötigte damals 2 Tage bei einem Materialverbrauch von 4 ml Plasma pro Bestimmung im Mol-Bereich. Heute werden im klassischen Aminosäureanalysator auf Ionenaustauscherbasis und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrin ca. 50 µl Plasma bzw. 1 µMol Probe benötigt bei einer Analysenzeit von ca. 2 Stunden für physiologische Proben.

Mit der Einführung der Hochdruckchromatographie (HPLC = High Performance Liquid Chromatography) wurde in neue Dimensionen vorgestoßen, was Empfindlichkeit und Kürze der Analysenzeit betrifft. Die Auftrennung erfolgt dabei meist über sogenanntes "reversed phase" Säulenmaterial (Silikagelpartikel, die mit hydrophoben Octadecyl Molekülen überzogen sind) durch hydrophobe Wechselwirkungen. Dazu ist eine Derivatisierung mit einer apolaren Verbindung vor der Auftrennung nötig, da die Aminosäuren selbst zu polar sind. Für diese Vorsäulen-Derivatisierung werden verschiedene Verbindungen verwendet: Bei der Derivatisierung mit Dansyl-Cl sind Bestimmungen bis in den µMol-Bereich möglich (Tapuhi et al., 1981). Eine Größenordnung empfindlicher sind die 4-Dimethylaminoazobenzol-sulfonsäurechlorid (DABS-Cl)- und die Orthophthalaldehyd (OPA)-Methode (Chang et al., 1981 a,b; Roth, 1971). Ein weiterer, jedoch sehr aufwendiger Weg wurde von Corradetti et al. (1983) gewählt - die Analyse mittels Massenspektrometrie.

Den biogenen Aminen wurde seitens der Analytik nicht so viel Aufmerksamkeit zuteil wie den Aminosäuren, obwohl ihre quantitative Bestimmung immer größere Bedeutung in der Neurophysiologie und Endokrinologie erlangt. Früher gängige Verfahren der Deriva-

tisierung und Gaschromatographie oder fluorometrischen Bestimmung wurden seit der Einführung der elektrochemischen Detektion (Kissinger et al., 1974, 1975) fast völlig verdrängt. Mit dieser Methode ist es möglich, im fMol-Bereich zu messen. Als Trennsystem hat sich auch hier inzwischen die HPLC etabliert. Man bedient sich der Ionenaustauschchromatographie (Kissinger et al., 1975) oder der Ionenpaar-Technik (Knox & Jurand, 1976), mit der diese Transmitter über reversed-phase (C_{18}) Säulenmaterial aufgetrennt werden können (Molnar & Horvath, 1976).

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, Analysensysteme, wie sie aus der Literatur bekannt waren, zu etablieren, um Transmittermessungen von Aminosäuren und biogenen Aminen in physiologischen Medien im pMol-Bereich zu ermöglichen.

M A T E R I A L und M E T H O D E N

1) Chemikalien

Alle Chemikalien waren von mindestens p.a. Qualität und wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen mit Ausnahme von:

Dopamin	Aldrich-Chemie (Steinheim, D)
Zitronensäure	T.J. Baker (Deventer, NL)
Natriumacetat	"
Octylsulfat	Eastman Kodak (Rochester, N.Y., USA)
Arterenol	Hoechst AG (Frankfurt, D)
Nomifensin	"
Suprarenin	"
Trisacryl GF 05	LKB (Bromma, S)
Acetonitril	Rathburn Chem. (Walkersburn, GB)
DABS-Cl	Serva (Heidelberg, D)
OPA	Sigma Chemical Cop. (St. Louis, Mo, USA)
di-n-Butylamin	"
3.4-DHBA	"
EDTA	"
Trizma Base	"
Mercaptopropionsäure	"
Aminosäuren Standard	"
Aluminium Woelm A	Woelm Pharma (Eschwege, D)

2. DABS-Cl-Derivatisierung und Chromatographie-System

Die Derivatisierung von Aminosäuren mit DABS-Cl erfolgte nach Chang et al. (1981 a,b). Dazu wurden zu je 50 µl Probe, gelöst in Natriumcarbonatpuffer (0.2 M/pH 9.0), 100 µl in Aceton gelöstes DABS-Cl (1.3 mg/ml) gegeben und 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Gemisch

mit Acetonitril/H₂O (1:1) auf 1,4 ml verdünnt und davon 20 µl für die Analyse verwendet. Die DABS-Cl-Lösung wurde wöchentlich frisch hergestellt und unter Stickstoff bei 4°C aufbewahrt.

Die Auftrennung erfolgte mittels HPLC auf einer Anlage der Firma Beckman (Model 332 Gradient Liquid Chromatograph System) über "reversed phase" Säulenmaterial. Aufgetragen wurde mit einem Model 500 Automatic Sampler, detektiert wurde mit einem Model 160 Absorbance Detector, ausgestattet mit einem Filter für 436 nm. Die Registrierung der Absorption erfolgte mit einem Chromatopac CR 1A Dataprocessor (Fa. Shimadzu, Japan). Als flüssige Phase diente Natriumacetatpuffer 0.04 M und Acetonitril mit einer Flußrate von 1.1 ml/min. Die Quantifizierung der Derivate erfolgte anhand der registrierten Peakfläche.

3. OPA-Derivatisierung und Chromatographie-System

Die Derivatisierung mit o-Phthalaldehyd erfolgte in Anlehnung an Godel et al. (1984). Dazu wurde ein Teil Probe mit 5 Teilen Methanol, 5 Teilen Natriumboratpuffer (0.1 M, pH 9.5) und 1 Teil eines Gemisches aus 50 mg OPA in 4.5 ml Methanol (gepuffert mit 450 µl Natriumboratpuffer 0.1 M, pH 9.5 und 50 µl 3-Mercaptopropionsäure), vermischt. Das OPA enthaltende Gemisch wurde wöchentlich frisch hergestellt und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 Teilen Natriumphosphatpuffer (15 mM, pH 7.2) gestoppt und 20 µl des Gemisches für die Analyse verwendet.

Die Auftrennung erfolgte mit der unter 2) beschriebenen Anlage. Als Detektor diente ein Spectra/GLO Fluorometer (Fa. Gilson) bestückt mit einer 10 µl Micro-Flow Cell. Es wurde die Filterkombination 7-60X Excitation (330-380 nm) und 3-73 M Emission (430-600 nm) verwendet. Als Laufmittel diente Natriumphosphatpuffer 12.5 mM, pH 7.2 und Acetonitril mit einer Flußrate von 1.2 ml/min. Die Berechnung erfolgte anhand der Peakfläche.

4. Bestimmung der biogenen Amine

a) Reinigung des Aluminiumoxids

Die Reinigung des Aluminiumoxids (Aluminium Woelm A) erfolgte in Anlehnung an Anton & Sayre (1962). Dazu wurden 100 g Al_2O_3 mit 500 ml 2N HCl 45 Minuten unter starkem Rühren aufgekocht. Nach kurzem Absetzen (1-1.5 Min.) wurde der Überstand dekantiert. Weiteren zwei Waschschritten mit je 250 ml 2N HCl bei 70°C (10 Min.) folgte einer mit 500 ml bei 50°C. Der letzte Schritt der Säurebehandlung erfolgte mit 150 ml 2N HCl Suprapur (Merck) bei 50°C für 10 Minuten. Danach wurde ca. 25 mal mit je 200 ml aqua bidest gewaschen bis der pH des Überstandes ca. 3-4 erreichte. Beim Abgießen wurden Fines (Teilchen sehr geringer Größe, die sehr langsam sedimentieren) mit dekantiert. Zuletzt wurde das Al_2O_3 3 Stunden bei 300°C getrocknet.

b) Anreicherung der biogenen Amine

Da biogene Amine nicht lyophilisierbar sind, müssen sie über Al_2O_3 angereichert werden. Dazu wurden zu 1 ml Probe 10 mg des oben beschriebenen Al_2O_3 , 400 µl 2 M Tris/HCl pH 8.4 mit 2% EDTA und ein interne Standard (DHBA) gegeben. Das Gemisch wurde 15 Minuten geschüttelt, kurz bei 12 000 g zentrifugiert und der Niederschlag 3 x mit H_2O gewaschen; nach dem letzten Waschschriff wurde der Überstand besonders sorgfältig abgenommen. Danach wurde je 100 µl 0.1 N HCl zugegeben, das Gemisch 5 Minuten geschüttelt und ca. 16 Stunden bei 0-4°C inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren (12 000 g) wurden 50 µl des Überstandes für die Analyse verwendet. Die gesamte Anreicherungsprozedur wurde bei 0°C durchgeführt und nur mit vorgekühlten Reagentien gearbeitet.

c) Analyse der biogenen Amine

Die Analyse der biogenen Amine erfolgte in Anlehnung an Müller und Unsicker (1981) mit HPLC und elektrochemischer Detek-

tion (ECD). Das System bestand aus einer Model 2150 HPLC Pump (Fa. LKB), einem Beckman 210 Injector und einem LC-4B Amperometric detector (Fa. bas) mit Glasfaser-Kohlenstoff-Einzelelektrode; das Potential war auf +680 mV eingestellt. Getrennt wurde über "reversed phase" Säulen; das Laufmittel enthielt 50 mM Natriumacetat, 20 mM Zitronensäure, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM Natriumoctylsulfat, 0.1 M di-n-Butylamin und organische Lösungsmittel bei einem pH von 4.6; die Flußrate betrug 1.0 ml/Min. Säule und Zelle waren mindestens 24 Stunden aequilibriert bevor Messungen durchgeführt wurden. Ein Zweikanalschreiber Modell SE 120 (Fa. BBC) wurde zur Registrierung verwendet. Die Berechnung erfolgte anhand der Peakhöhe.

d) Behandlung biologischer Proben

Die Versuche mit Schneckenganglien wurden in einer Ringer-Lösung durchgeführt die 39 mM NaCl, 1.3 mM KCl, 4.5 mM CaCl_2 , 1.5 mM MgCl_2 und 7 mM NaHCO_3 enthielt und mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) auf pH 7.2-7.5 gehalten wurde.

Proben und Ganglien wurden im Anschluß an die Versuche bis zur Verarbeitung bei -20°C gehalten.

Die Ganglien wurden von Hand bei 0°C homogenisiert, wobei die Proteine durch Zugabe von Perchlorsäure zu einer Endkonzentration von 0.5 M ausgefällt und bei 12 000 g (5 min) abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde der Anreicherung zugeführt, wobei der interne Standard in diesem Fall bereits vor der Homogenisierung zugesetzt worden war.

ER G E B N I S S E

I. Aminosäureanalyse mit DABS-Cl Derivatisierung

a) Versuche mit Standardlösungen

Im ersten Teil der Arbeit stand die Aminosäureanalyse im Mittelpunkt. Aus praktischen Erwägungen (ein Durchflußphotometer war vorhanden) wurde zunächst die Methode der Derivatisierung nach Liu & Chang (1975) gewählt. Das dabei verwendete DABS-Cl ermöglicht eine Auftrennung der Derivate über eine "reversed phase"- Säule und wegen seiner starken Absorption bei 436 nm ist die Analyse von pMol Mengen möglich (Chang et al., 1981 a,b). Zusätzlich ist bei dieser Methode ist die Stabilität der Derivate von Vorteil, die den Einsatz eines automatischen Probengebers ermöglicht.

Wie Chang et al. (1981a) beschreiben, war es notwendig, für die verwendete Säule ein passendes System von Puffer-pH und Gradient des apolaren Lösungsmittels (Acetonitril) zu finden, da die C₁₈-Säulenmaterialien von verschiedenen Herstellern (aber auch verschiedene Chargen des gleichen Herstellers) unterschiedliche Retentionszeiten für die Aminosäurederivate ergeben (Liebzeit & Dawson, 1981; Lammens & Verzele, 1978). Für die zunächst verwendete Säule (Zorvax ODS, Du Pont) war das in der Literatur (Chang et al., 1981a) angegebene System von Puffer-pH (4.5) und Gradient ungeeignet, da viele Aminosäuren co-eluierten.

Als optimal stellte sich ein System heraus, das bei pH 3.35 mit 50 mM Na-Acetatpuffer und dem in Abb. 2 gezeigten Gradienten arbeitete. Zwischen Minute 23 und 28 wurde zusätzlich die Flußrate auf 1.5 ml/min erhöht, um die Auflösung der Peaks weiter zu verbessern. Eine Auftrennung von Glutamin (Q) und Glutaminsäure (E) einerseits und Leucin (L) und Isoleucin (I) andererseits war bei diesem System nicht möglich, wobei das letztere Paar für die

Bestimmung von Neurotransmittern nicht von Bedeutung ist. Wird speziell Wert auf die Trennung von E und Q gelegt, so könnte dies durch Änderung der Bedingungen erreicht werden, jedoch mit schlechteren Auftrennungen in anderen Bereichen.

Ein besonderes Problem stellte die Präzision dieser Methode dar. Zunächst war die Reproduzierbarkeit sehr schlecht, bis sich herausstellte, daß aus den Reaktionsgefäßen bei der Inkubation

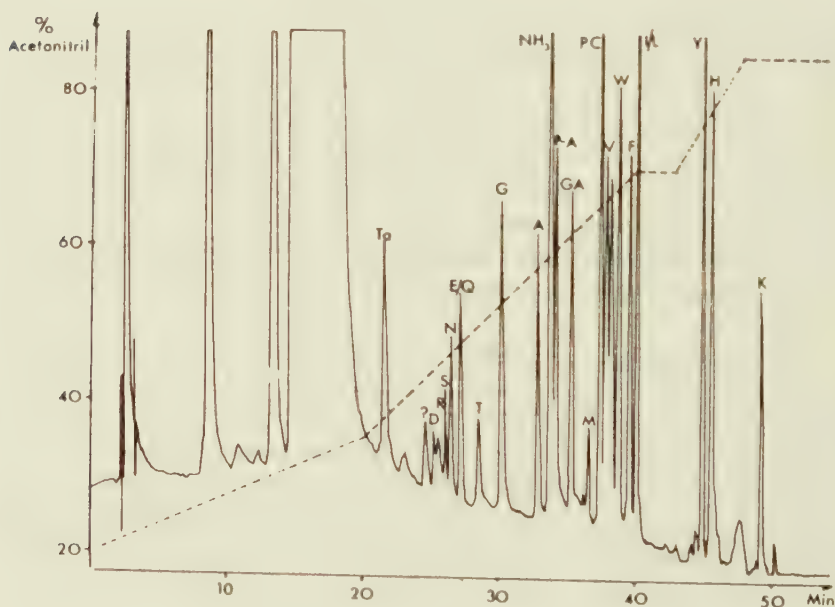


Abb. 2. Auftrennung von DABS-Aminosäuren auf einer Zorvax ODS-Säule mit Na-Acetatpuffer (50 mM, pH 3.35) und ansteigendem Acetonitrilgradienten (---) bei Raumtemperatur. Die Flußrate betrug 1.1 ml/min, zwischen Minute 23-28 wurde sie auf 1.5 ml/min erhöht. Ein Peak entspricht 20 pMol Aminosäure. Bezeichnung der Peaks in der Ein-Buchstaben Nomenklatur (siehe Abkürzungen).

unterschiedliche Mengen von Aceton entwichen. Durch die Verwendung gasdichter Gefäße (Fa. Sarstedt) konnte die Präzision auf ca. $\pm$ 5-15% verbessert werden. Diese Schwankungen waren allerdings bei verschiedenen Versuchen für die einzelnen Aminosäuren wiederum sehr unterschiedlich. Eine weitere Verbesserung der Reproduzierbarkeit wurde nicht vorangetrieben, da sich ein zusätzliches, gravierenderes Problem bei Analysen aus physiologischen Medien zeigte.

b) Versuche mit physiologischen Medien

Es sollte die Aminosäurekonzentration in Superfusaten von Hirnschnitten des Hippocampus von Ratten bestimmt werden. Das dazu verwendete Medium (CSF) enthielt 124 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 1.25 mM KH_2PO_4 , 2.4 mM MgSO_4 , 2.5 mM CaCl_2 , 25.7 mM NaHCO_3 und 10 mM Glukose und wurde durch Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) auf pH 7.4 gehalten.

Die zunächst verwendete Glucose für biologische Zwecke stellte sich als stark verunreinigt heraus, geeignet war Glucose p.a. der Fa. Serva.

Direkt aus dem Superfusat Aminosäuren zu bestimmen, war nicht möglich, da ihre Konzentration zu gering war. Es war also nötig, die Lösungen durch lyophilisieren zu konzentrieren.

Derart konzentrierte Proben ergaben nicht reproduzierbare Ergebnisse, es konnte kein Standard-Aminosäure-Chromatogramm erzeugt werden. Zunächst wurde angenommen, daß eine der Komponenten im Puffer die Reaktion des DABS-Cl mit den Aminosäuren stört (speziell Chlorid könnte das Reaktionsgleichgewicht verschieben). Durch sukzessives Ersetzen der einzelnen Ionen konnte sichergestellt werden, daß keines der Ionen individuell der Grund dieses Effektes war.

Als Nächstes wurde der Einfluß der Salzkonzentration auf die Derivatisierung untersucht. Standard-Aminosäuren-Gemische wurden in verschiedenen Pufferkonzentrationen aufgenommen und dann der

DABS-Cl-Reaktion unterworfen; ab einer Molarität von ca. 0.6 war eine deutliche Beeinträchtigung der Reaktion mit Glutamin, Glutaminsäure und Asparagin zu beobachten, ab ca. 1.5 molar war keine Analyse mehr möglich (Abb. 3).

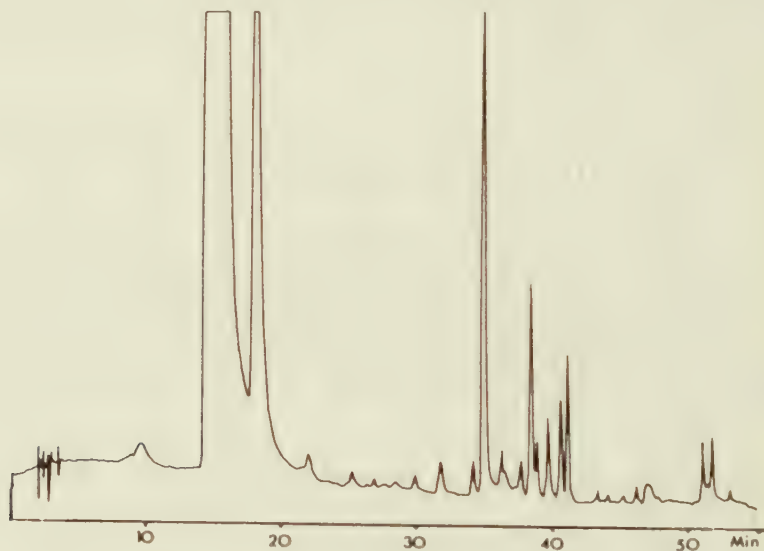


Abb. 3. Chromatogramm eines Standard-Aminosäure-Gemisches mit den in Abb. 2 angegebenen Bedingungen. Die Aminosäuren waren jedoch zum Derivatisieren in zehnfach konzentriertem CSF-Puffer gelöst.

c) Versuche zur Trennung von Aminosäuren und Salzen

Es boten sich nun zwei Möglichkeiten an, diese Schwierigkeit zu umgehen: die Salze von den Aminosäuren zu trennen oder die Reaktion im verdünnten Puffer ablaufen zu lassen und danach die

Reaktionsprodukte zu konzentrieren.

Für den Weg, Aminosäuren und Salze zu trennen, wurden verschiedene kommerzielle Systeme getestet, wie sie üblicherweise, z.B. zur Anreicherung von Aminosäuren in der Wasserchemie, Verwendung finden. Benzosulfonsäure-Säule (Fa. Baker), Sep-pak Silica (Fa. Millipore) und Mischbett-Ionenaustauscher (Fa. Serva) wurden nach Vorschrift verwendet. Bei Einsatz von jedoch nur 10 pMol/Aminosäure konnte bei keiner Methode eine auch nur grobquantitative Rückgewinnung erzielt werden.

Eine weitere Möglichkeit ist eine Trennung nach Molekulargewicht, da Glycin, die kleinste der Aminosäuren, ein Molekulargewicht von 100 Dalton hat und Natrium bzw. Chlorid solche von 23 bzw. 35.5 Dalton.

Als Säulenmaterialien dienten Fractogel (Fa. Merck) und Trisacryl GF 05 (Fa. LKB). Es wurden Säulen von 20 cm Länge und 2 cm Durchmesser verwendet. Die Analyse der freien Aminosäuren erfolgte mit Ninhydrin; Chlorid wurde mit dem Chloridmeter 6610 (Fa. Eppendorf) und Natrium mit dem Atomabsorptionsphotometer Model 380 (Fa. Perkin-Elmer) bestimmt.

Die getesteten lyophilisierbaren Puffersysteme waren: Athanol/H₂O (3:1 und 1:1), Aceton/H₂O (1:1) und 0.4% Trifluoressigsäure (TFA) mit jeweils 1% oder 10% Aceton bzw. Acetonitril. Keines der Systeme konnte eine Trennung der Aminosäuren von Natrium- oder Chlorid-Ionen erbringen. Trisacryl zeigte mit 0.4% TFA und 10% Acetonitril eine reproduzierbare Trennung von Aminosäuren und Chlorid, wobei jedoch Natrium zusammen mit den Aminosäuren wanderte. Dies weist auf einen Ionenaustauschereffekt des Säulenmaterials hin. Wurden die Fraktionen, die Aminosäuren enthielten, gepoolt und lyophilisiert, konnten reproduzierbare Standard-Chromatogramme der DABS-Aminosäuren erzeugt werden. Dieses System hat allerdings auch entscheidende Nachteile: zum einen der hohe Zeitaufwand pro Probe, zum anderen die Instabilität des Trisacryl Säulenmaterials, das unter diesen Bedingungen nach ca. 5-8 Durchläufen "auszubluten", d.h. sich zu zersetzen beginnt.

d) Versuche zur Reinigung des DABS-Cl

Die zweite Möglichkeit, die DABS-Cl-Reaktion in verdünntem Puffer ablaufen zu lassen und dann die Reaktionsprodukte zu konzentrieren, erwies sich leider auch als nicht realisierbar.

Das im Handel erhältliche DABS-Cl enthält eine Anzahl verschiedener Verbindungen, die ebenfalls bei 436 nm absorbieren und unter den gewählten Bedingungen im Trennbereich der "reversed phase"-Säulen liegen, sie treten normalerweise nicht in Erscheinung, da bei der Methode nach Chang et al. (1981) das Reaktionsgemisch vor der Trennung verdünnt wird. DABS-Cl von verschiedenen Herstellern wurde auf seine Reinheit geprüft und das beste Produkt (Serva) zusätzlich zweimal aus Aceton umkristallisiert, aber selbst dann waren so viele störende Verbindungen enthalten, daß eine Konzentrierung nicht möglich war.

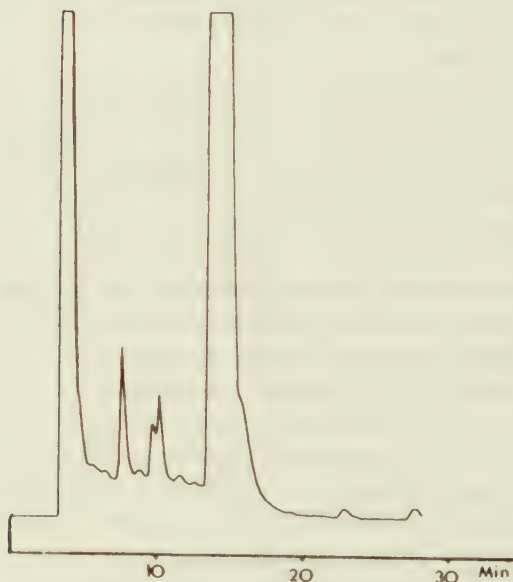


Abb. 4)

Auftrennung von DABS-Cl über "reversed phase"-Säulenmaterial. Gradient 50-100% Lösungsmittel in H_2O , linear, über 30 Minuten (siehe Text).

Es wurde nun versucht das DABS-Cl über "reversed phase"-Säulen zu reinigen. Zuerst wurde das für die Aminosäuretrennung verwendete System H_2O -Acetonitril getestet. Als Startgemisch diente eine Mischung von 1:1 H_2O /Lösungsmittel, da DABS-Cl erst bei 50% Acetonitril in Lösung geht; der Gradient war linear bis 100% Lösungsmittel bei einer Laufzeit von 30 Minuten.

Es erschien zuerst eine gelbe Komponente und bei höheren Lösungsmittelkonzentrationen eine rote, diese war mit Aminosäuren reaktiv, die gelbe nicht. Die reaktive Komponente ließ sich durch Änderungen des Gradienten nicht weiter auftrennen. Auch die Verwendung von Lösungsmitteln mit etwas anderen Eigenschaften (Aceton, Dioxan, Tetrahydrofuran) (Snyder, 1974) erbrachte im Prinzip immer das gleiche Elutionsprofil (Abb.4). Es waren lediglich quantitative Unterschiede zwischen gelber und roter Komponente feststellbar, die wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Stabilität des DABS-Cl in diesen Lösungsmitteln zurückzuführen ist. Mit Acetonitril z.B. war nach 24 Stunden Lagerung nur noch die gelbe Komponente vorhanden.

Die reaktive Komponente, gleichgültig mit welcher Methode isoliert, zeigte jedoch nach der Reaktion in Carbonatpuffer pH 9.5 ebenfalls wieder die Verbindungen, die die Konzentrierung unmöglich machen. Es muß also angenommen werden, daß diese Nebenprodukte erst bei der Reaktion entstehen.

Wegen der Probleme physiologische Medien zu verarbeiten und wegen der bereits mit Standards schlechten Reproduzierbarkeit wurde die DABS-Cl-Derivatisierung nicht weiter verfolgt und statt dessen auf die o-Phthalaldehyd-Derivatisierung übergegangen.

II. Die Derivatisierung mit o-Phthalaldehyd

Aminosäurebestimmungen mittels o-Phthalaldehyd (OPA) sind auch aus konzentrierten bzw. lyophilisierten Proben möglich (Godel et al., 1984, Hodkin et al., 1983), was einen großen Vorteil gegenüber der DABS-Cl Derivatisierung darstellt. Nachteile der Methode sind, daß OPA mit Prolin nicht und mit Cystein sehr

schlecht reagiert (was jedoch für die Transmitterbestimmung nicht relevant ist) und die Instabilität der Reaktionsprodukte bei Verwendung von Ethanediol oder β -Mercaptoethanol als reduzierenden Agentien. Erst die Einführung von 3-Mercaptopropionsäure durch Godel et al. (1984) erhöhte die Stabilität der Reaktionsprodukte auf über eine Stunde und macht reproduzierbares Arbeiten auch bei nicht automatisierter Probenverarbeitung ohne weiteres möglich.

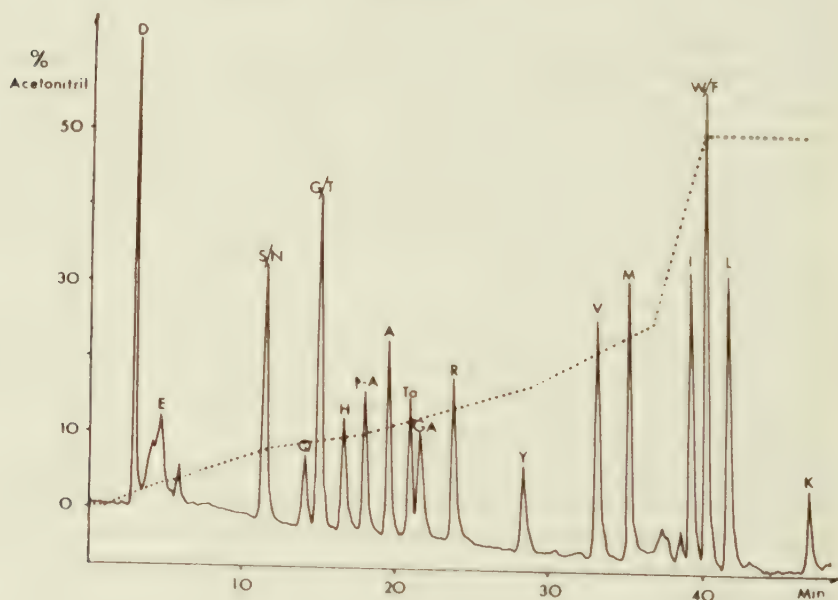


Abb. 5) Auftrennung der OPA-Aminosäuren

Die Auftrennung erfolgte über eine Ultrasphere-ODS-Säule (Fa. Beckman) mit Na-Phosphat-Puffer pH 7.2, 12.5 mM und aufsteigendem Acetonitrilgradienten (.....) bei 25°C und einer Flußrate von 1.2ml/min. Aufgetragen: 20 pMol pro Aminosäure.

Das bei Godel et al. (1984) verwendete System von Natrium-Phosphat-puffer (pH 7.2, 12.5 mM) mit Acetonitril-Gradient ließ sich, mit leichten Änderungen (Lindroth & Mopper, 1974), direkt übernehmen. Zunächst wurde, wie bei diesen Autoren beschrieben, C₈-Säulenmaterial (LiChrocart, Fa. Merck) verwendet. Diese Säulen zeigten jedoch bereits nach wenigen (ca. 20) Analysen eine Abnahme der Trennschärfe, die sich durch eine Verbreiterung der Peaks ausdrückte, und die weiter zunahm. Es wurde festgestellt, daß sich das Säulenmaterial "gesetzt" hatte und eine Untersuchung seitens des Herstellers zeigte eine Zerstörung der sphärischen Struktur des Säulenmaterials. Dieser Effekt wurde zunächst dem hohen pH-Wert der Probe (pH 9.5) zugeschrieben, nach neueren Informationen (Dr. Schneider, pers. Mitteilung) lag jedoch wahrscheinlich eine mechanische Zerstörung des empfindlichen Säulenmaterials durch die Pulsation der Pumpen vor.

Aus diesem Grunde wurde mit C₁₈-Säulenmaterial gearbeitet (Ultrasphere-ODS, Fa. Beckman), das eine höhere mechanische Stabilität zeigt, jedoch die Paare Serin(S)/Asparagin(N) und Glycin(G)/Threonin(T) nicht mehr auftrennt (Abb. 5). Tryptophan (W) und Phenylalanin (F) wurden auch auf C₈-Material nicht aufgetrennt.

Das Detektionslimit lag bei ca. 4-5 pMol pro Aminosäure; diese, im Gegensatz zur Literatur, hohe Grenze war durch das verwendete Fluorometer bedingt. Zum einen zeigte die in dem Gilson Gerät verwendete Halogenlampe ein so starkes Rauschen, daß zwischen Detektor und Schreiber ein 0.7 Hz Tiefpass-Filter geschaltet werden mußte, um Messungen im pMol-Bereich zu ermöglichen; zum anderen liegen die Wellenlängen von Exzitations- und Emissionsfilter zu nahe beieinander, was ebenfalls einen höheren Background erzeugt (Hill et al., 1979).

Die Retentionszeiten der einzelnen Aminosäurederivate sind stark temperaturabhängig, was eine möglichst genaue Temperierung der Säule notwendig macht. Als eine billige und effektive Methode erwies sich ein Silikonschlauch, der dicht um die Säule gewickelt wird und an ein Wasserbad mit Umlaufpumpe (Fa. Lauda) angeschlossen ist. Die Versuche wurden bei einer Temperatur von 25°C ausgeführt und die in Tabelle I aufgeführten Retentionszeiten dabei

festgestellt. Trotzdem war es nicht immer möglich, die Auswertung der Chromatogramme zu automatisieren (was mit dem Shimadzu CR 1A unter bestimmten Bedingungen möglich ist), da die absoluten Retentionszeiten auch mit Temperierung und automatischem Probenaufgeber von Zeit zu Zeit stärker schwankten. Der Grund dafür konnte nicht gefunden werden, es wird jedoch vermutet, daß leichte Änderungen im pH-Wert des Puffers oder in der Dauer der Voraquilibration des Systems damit zu tun haben.

Tabelle I

Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten von 20 Aminosäuren und deren Analoga aus 8 Läufen mit Standardgemischen in Wasser, angegeben als durchschnittliche Retentionszeit nach Injektion (F) und dem Variationskoeffizienten (VC).

	F	VC		F	VC
Asp	2.95	<u>+5%</u>	Tau	26.9	<u>+5%</u>
Glu	6.85	<u>+10%</u>	Arg	28.5	<u>+4.5%</u>
Asn/Ser	15.02	<u>+8%</u>	Tyr	33.15	<u>+3.5%</u>
Gln	19.5	<u>+6%</u>	Val	36.75	<u>+3%</u>
Gly/Thr	20.45	<u>+6%</u>	Met	38.2	<u>+3%</u>
His	22.25	<u>+5%</u>	Ile	41.85	<u>+2%</u>
β -Al	24.0	<u>+6%</u>	Phe/Trp	42.7	<u>+2%</u>
Ala	25.4	<u>+5%</u>	Leu	43.85	<u>+2%</u>
			Lys	46.75	<u>+2%</u>

Die Reproduzierbarkeit wurde wiederholt getestet und betrug durchschnittlich $\pm 8\%$; manchmal wurden jedoch Variationen von über $+10\%$ festgestellt. Zwischen 5 und 40 pMol war der Anstieg

der Fluoreszenz hinreichend linear.

Messungen zur Abhängigkeit der Fluoreszenzausbeute vom Mischungsverhältnis Aminosäuren(AA) zu OPA zeigten ein Maximum der Fluoreszenz bei einem molaren Verhältnis von 1:50 (AA /OPA) (Abb. 6), wahrscheinlich bedingt durch ein Optimum der Derivatisierungsreaktion. Ungeklärt blieb, warum dieses Maximum für die minimal verwendete Konzentration von 55 pMol im Reaktionsansatz, entsprechend 5 pMol aufgetragene Menge, bei 1:100 lag. Bei Analysen muß also darauf geachtet werden, daß im linearen Bereich unterhalb von 25:1 (Aminosäuren: OPA) gearbeitet wird.

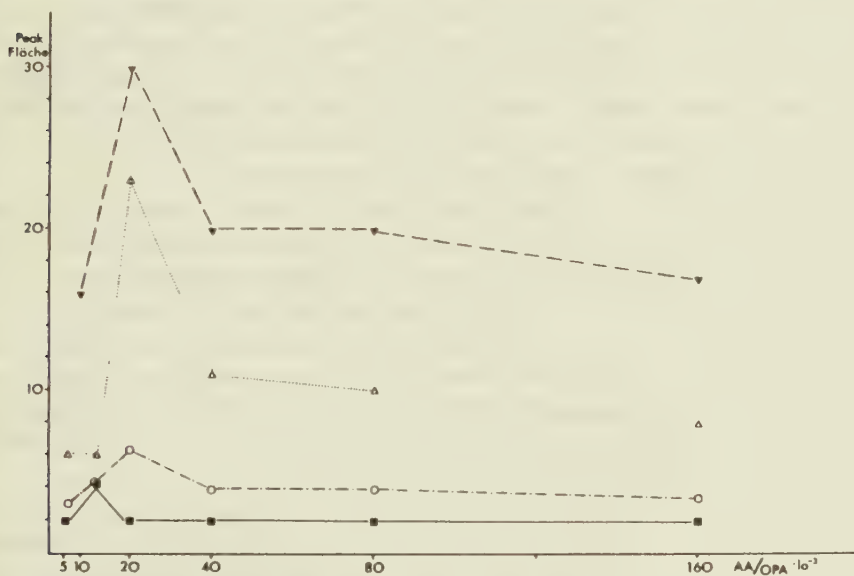


Abb. 6. Abhängigkeit der Fluoreszenzausbeute vom molaren Mischungsverhältnis von Aminosäuren (AA) zu OPA.

Ein Maximum der Fluoreszenzausbeute tritt bei einem Mischungsverhältnis von 1:50 (AA:OPA) bei 40pMol (▼), 20 pMol (Δ) und 10 pMol (○) auf; bei 5 pMol (■) liegt dies bei 1:100. Die Werte der Abbildung beziehen sich auf Glycin andere Aminosäuren (Asp, Asn, His, Tyr), zeigen das gleiche Verhalten.

3. Die Analyse von biogenen Aminen

a) Zur Methodik

Die Analyse der biogenen Amine wurde in Anlehnung an Müller & Unsicker (1979) durchgeführt. Dabei erfolgt die Auftrennung mittels HPLC über "reversed phase"-Säulenmaterial und die Detektion mittels ECD (elektrochemischer Detektion). Diese Methode ist sehr empfindlich und stellt deswegen höchste Ansprüche an die Reinheit der Reagentien und die Handhabung der Apparatur. Essentiell ist eine gute Erdung sämtlicher Teile des Systems über nur einen Erdungspunkt; ebenso wichtig ist die Vermeidung von statischen Aufladungen der Personen, die in der Nähe des Gerätes arbeiten (Medford, 1981; Roojar & Poppe 1983).

Bei den Reagentien sind Produkte mancher Hersteller besser geeignet; eine Zusammenstellung von Substanzen, die auf ihre Eignung getestet wurden, haben mir dankenswerterweise Prof.M. Ackenheil und Prof.N. Matussek zur Verfügung gestellt (siehe Chemikalien). Ein besonderes Problem stellt das zu verwendende Wasser dar. Kaufliches aqua bidest erwies sich als nicht rein genug; es wurde deswegen entweder Wasser aus einer milli-q-Anlage (Fa. Millipore) oder aus einer Quarzglasbidestille (Fa. Westd. Glashütte, Geesthacht) verwendet.

Unter optimalen Bedingungen lag die Grenze der Detektierbarkeit bei ca. 50 fMol Katecholamin, wobei die Präzision unterhalb von ca. 200 fMol mit $\pm 20\%$ sehr schlecht war. Bei größeren Mengen, ab ca. 200 fMolen, war die Präzision für Adrenalin und Noradrenalin durchschnittlich ca. $\pm 10\%$, für Dopamin und 3,4 DHRA $\pm 2.55\%$ bzw. $\pm 2.05\%$. Die Schwankungen der Quotienten von internem Standard zu Adrenalin bzw. Noradrenalin waren wiederum ca. $\pm 10\%$ zu Dopamin $\pm 3.0\%$. Die Peakhöhe verminderte sich um 30% bei Analysen aus physiologischen Medien verglichen mit Wasser.

Um einen möglichst hohen Probendurchsatz zu ermöglichen, war eine kurze Analysenzeit wünschenswert. Die aus der Literatur

(s.o.) übernommene Methode mit Zusatz von 5% Methanol zum Laufmittel zeigt für Dopamin eine Retentionszeit von 18 Minuten. Durch die Beimischung von 7% Methanol und 5% Acetonitril konnte die Analysenzeit für Dopamin auf 10 Minuten reduziert werden (Abb. 7A). Höhere Methanolkonzentrationen alleine bewirken keine Verkürzung unter 18 Minuten, Acetonitril alleine kann die Retentionszeiten verkürzen, jedoch nur bei gleichzeitig verringerter Trennschärfe.

Dem in den Experimenten mit biologischem Material verwendeten Puffer war Ascorbinsäure 0.1 mM als Oxidationshemmer zugesetzt (Westerink, 1983), und bei Verwendung der Ultropac TSK ODS-Säule (Fa. LKB) erschien diese Substanz im Pufferpeak und störte die Analyse nicht. Dieses Säulenfabrikat hat jedoch einen wesentlichen Nachteil: die Filterscheibe (inlet-Frit) am Säulenanfang ist nicht austauschbar. Dies wirkt sich besonders bei der Katecholaminanalyse negativ aus, da der Oberstand der Anreicherung noch feine Teilchen (Fines) des Al_2O_3 enthält, die das Frit verstopfen und damit den Druck über der Säule über das erlaubte Limit ansteigen lassen. Diese Fines lassen sich nur mit einigem Aufwand und vor allem Verlust von Analysesubstanz aus der Probe entfernen. Die Verwendung einer Vorsäule als Schutz ist bei dieser Analyse kritisch, da sie eine Verminderung der Trennschärfe mit sich bringt. Bei Verwendung der LiChrospher CH-18-Säule (Fa. Merck) überlagerte der Ascorbinsäurepeak die Analyse der Katecholamine, gleiches gilt für die (speziell für die Katecholaminanalyse ausgelegte) Säule der Fa. Waters (die mir dankenswerterweise für Testzwecke zur Verfügung gestellt wurde). Gut verwendbar war wiederum die Ultrasphere ODS-Säule (Fa. Beckman), mit der dann die Analysen des biologischen Materials durchgeführt wurden.

b) Gehalt an biogenen Aminen im zircooesophagalen Ganglion der Schnecke *Planorbis corneus*

Dopamin ist das Katecholamin, das im Nervensystem von Mollusken hauptsächlich gefunden wird und Informationen zu seiner

Verteilung, seinem Metabolismus und seiner Pharmakologie liegen für diese Tiere vor (Gospe, 1983; S.-Rozza, 1984). Nur wenige Autoren haben aber bisher versucht die Freisetzung von endogenem Dopamin zu messen (Satchel & Twarog, 1979), wahrscheinlich wegen der sehr geringen Mengen, die dabei nachgewiesen werden müssen. In dieser Arbeit wurde die sehr empfindliche Methode der elektrochemischen Detektion (ECD) für die quantitative Bestimmung des Gehaltes und der Freisetzung von endogenen Katecholaminen aus dem zirkumoesophagalen Ganglion der Schnecke *Planorbis corneus* eingesetzt.

Die Versuche wurden zwischen Juli 1984 und Mai 1985 an mehr als 70 Schnecken ausgeführt; sie wurden unter Laborbedingungen (Raumtemperatur 20-25°C) in Aquarien gehalten und mit grünem Salat gefüttert. Die zirkumoesophagalen Ganglien wurden vom Buccalganglion freipräpariert und die Nerven so knapp wie möglich abgeschnitten.

Dopamin wurde im zirkumoesophagalen Ganglion von *Planorbis* in einer Konzentration von durchschnittlich $11.93 \pm 0.32 \mu\text{g g}^{-1}$ Naßgewicht gefunden ($n=32$, Durchschnittsgewicht der Ganglien $2.35 \pm 0.06 \text{ mg}$). Während des Sommers wurde Dopamin in signifikant höheren Konzentrationen gefunden als im Winter und im Frühjahr (durchschnittlich $13.74 \pm 0.44 \mu\text{g g}^{-1}$, $n=7$ verglichen mit $11.48 \pm 0.30 \mu\text{g g}^{-1}$ $n=25$; Students t-test $p>0.95$).

In den Chromatogrammen konnte auch Noradrenalin als Inhaltsstoff der Ganglien festgestellt werden (Abb. 7B). Dieses Amin zeigte einen ähnlichen jahreszeitlichen Verlauf wie Dopamin, es wurde im Sommer ($0.57 \pm 0.05 \mu\text{g g}^{-1}$, $n=6$) in höheren Konzentrationen als im Frühjahr und Winter ($0.31 \pm 0.02 \mu\text{g g}^{-1}$, $n=15$) gefunden (Students t-test $p>0.95$). Diese Substanz konnte nicht bei allen Ganglien festgestellt werden. Dies war durch das immer vorhandene Rauschen der Grundlinie bedingt, das von Tag zu Tag verschieden stark ausfallen konnte und immer wieder die Identifizierung kleiner Peaks unmöglich machte.

Bei sehr guter Grundlinie konnte ein Peak mit der Retentionszeit von Adrenalin identifiziert werden, der einer Konzentration von ca. $0.08 \pm 0.009 \mu\text{g g}^{-1}$ ($n=6$) entspricht. Zusätzlich

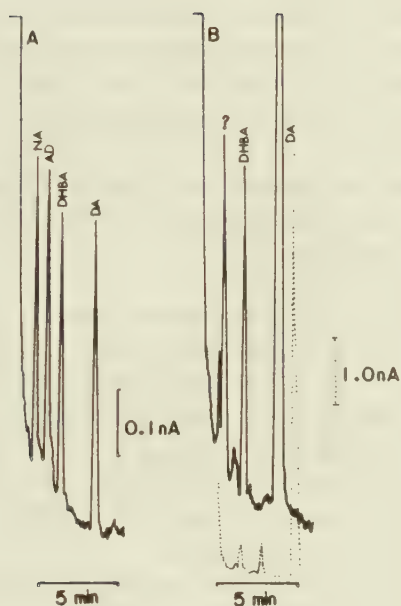


Abb. 7) Identifizierung von biogenen Aminen mittels HPLC.
 (A) Auftrennung von Katecholaminen einer Standard-Lösung (aufgetragen je 1 pMol) und (B) von einem Extrakt aus einem Schneckenganglion. Die gestrichelte Linie in (B) zeigt das gleiche Chromatogramm wie die durchgezogene Linie, mit einem Zehntel der Verstärkung. Peaks entsprechend Dopamin (DA), Noradrenalin (NA) und Adrenalin (AD) konnten im Schneckenganglion-Extrakt festgestellt werden, ebenso wie eine unbekannte Substanz (?). 1 pMol 3,4 Dihydroxibenzaldehyd (DHBA) wurde den Proben als interner Standard zugegeben.

trat hin und wieder ein Peak einer Substanz mit einer Retentionszeit zwischen Adrenalin und Noradrenalin auf (Abb. 7B); sie konnte nicht identifiziert werden, es handelt sich dabei jedoch weder um Serotonin, noch um Octopamin oder DOPA.

c) Freisetzung von Dopamin aus einzelnen Ganglien von Planorbis und Einflüsse von K^+ und Blockern der Dopaminaufnahme.

Für die Freisetzungsexperimente wurden einzelne Ganglien in 1 ml Schnecken-Ringer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jeweils 1 Stunde wurden sie kurz mit wenig Flüssigkeit abgespült und in frischen Ringer überführt. Die Inkubationsflüssigkeit wurde sofort bei -20°C eingefroren und bei dieser Temperatur bis zur Analyse (nach spätestens 48 Stunden) belassen. Gleichartig behandelte Standardlösungen zeigten keinen merkbaren Abbau der Katecholamine unter diesen Bedingungen.

In den Inkubationsmedien wurde für die erste Stunde ein Dopamingehalt von 24.05 ± 3.06 pg pro Ganglion und Stunde ($n=32$) gemessen (Abb. 8A, 9A). Diese Freisetzung von Dopamin, die keinen Zusammenhang zum Gangliongewicht oder Dopamingehalt zeigte, war über den Zeitraum von 4 Stunden ungefähr konstant (Abb. 9A).

Kalzium-freier Ringer während der 2. Stunde Inkubation erzeugte zwei verschiedene Muster der Dopaminfreisetzung. Bei manchen Ganglien führte er zu einer verminderten Freisetzung, bei anderen zu einer Erhöhung, die auch in der 3. Stunde anhielt, wenn die Ganglien bereits wieder in normalen Ringer überführt worden waren (Abb. 9B).

Der Gehalt an Dopamin im Medium konnte eindeutig durch Verwendung von Ringer mit hoher K^+ -Konzentration erhöht werden (Abb. 9B). Dazu wurden die Ganglien während der zweiten Stunde in einem Medium inkubiert, bei dem 25 mM NaCl durch KCl ersetzt war. Es konnte keine vermehrte Freisetzung von Noradrenalin oder Adrenalin festgestellt werden, jedoch wurden hin und wieder zwei nicht identifizierte Substanzen freigesetzt (Abb. 8B).

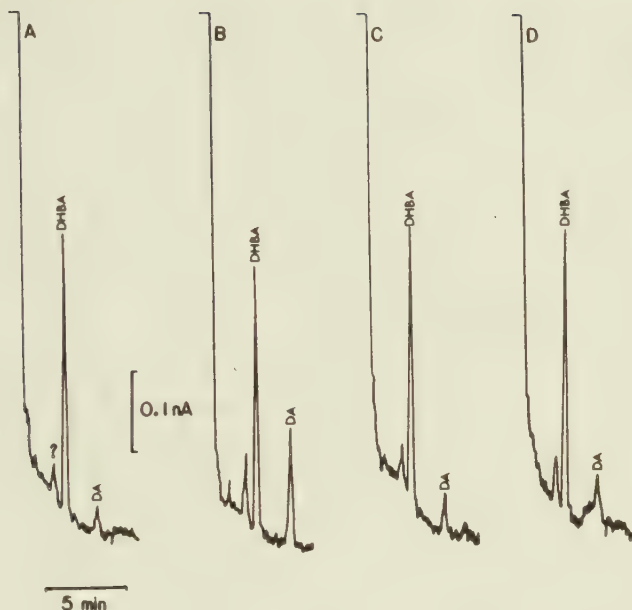


Abb. 8) Freisetzung von endogenem Dopamin aus einem einzelnen Schneckenganglion.

Ein zirkumoesophagales Ganglion von *Planorbis corneus* wurde jeweils 1 Stunde in 1 ml Ringer inkubiert, und dieser dann auf seinen Katecholamingehalt untersucht. Das Ganglion wurde zuerst in Standardringer (A), dann in Ringer mit hoher K⁺-Konzentration (B) und wiederum zweimal in Standardringer (C,D) inkubiert. Die erhöhte K⁺-Konzentration verstärkt die Freisetzung von Dopamin und zwei nicht identifizierte Substanzen aus dem Ganglion. 1 pMol DHBA war jeder Probe als interner Standard zugesetzt.

Die Erhöhung der Dopamin Freisetzung wurde noch verstärkt, wenn das Medium den Blocker der Dopaminaufnahme Nomifensin (Tuomisto, 1977) oder Chlorpromazin (Osborne et al., 1975) in einer Konzentration von 10^{-5} M enthielt (Abb. 10D). In zwei Versuchen konnte auch mit 10^{-5} M Benzotropin (Hiripi et al., 1982) eine ca. fünffache Erhöhung des Dopaminbasiswertes festgestellt werden. Eine Erhöhung der Konzentration von Aufnahmeblocker auf 10^{-4} M erbrachte keine weitere Steigerung. Die Freisetzung von Dopamin in Anwesenheit von Aufnahmeblockern war nicht erhöht ohne erhöhte K^+ -Konzentration (Abb. 9E).

Die durch Nomifensin bei hoher K^+ -Konzentration beobachtete Freisetzung von Dopamin ist abhängig von der Konzentration des Kalziums im Medium (Abb. 9F), wie man bei synaptischer Freisetzung des Transmitters erwarten würde. Mit Chlorpromazin dagegen wurde bei erhöhter K^+ -Konzentration auch in Abwesenheit von Ca^{2+} Dopamin in erhöhten Mengen freigesetzt (Abb. 9F).

Es wurde der Versuch unternommen, die Dopaminfreisetzung durch Stimulierung eines einzelnen Neurons zu messen. Dazu wurden in zwei Versuchen von Dr. A. Barber eines der identifizierten "giant dopamine containing neurons" (GDC) des hinteren Fußganglions (Berry & Pentreath, 1978; Marsden & Kerkut 1970) mit 2000 Spikes h-1 eine Stunde lang in der Anwesenheit von 10^{-5} M Nomifensin stimuliert. Die Identität des Neurons als GDC wurde durch seine Größe, Lokalisation und charakteristische Form nach Injektion des Farbstoffs Lucifer Yellow (Berry & Pentreath, 1978) sicher gestellt. Es konnte keine erhöhte Freisetzung von Dopamin festgestellt werden. Auch eine Analyse des Mediums im Labor von Prof. Ackenheil und Prof. Matussek mit einer Apparatur, die eine 8-fach höhere Empfindlichkeit hatte, als die in unserem Labor verwendete, zeigte keine Erhöhung der Dopamin Freisetzung.

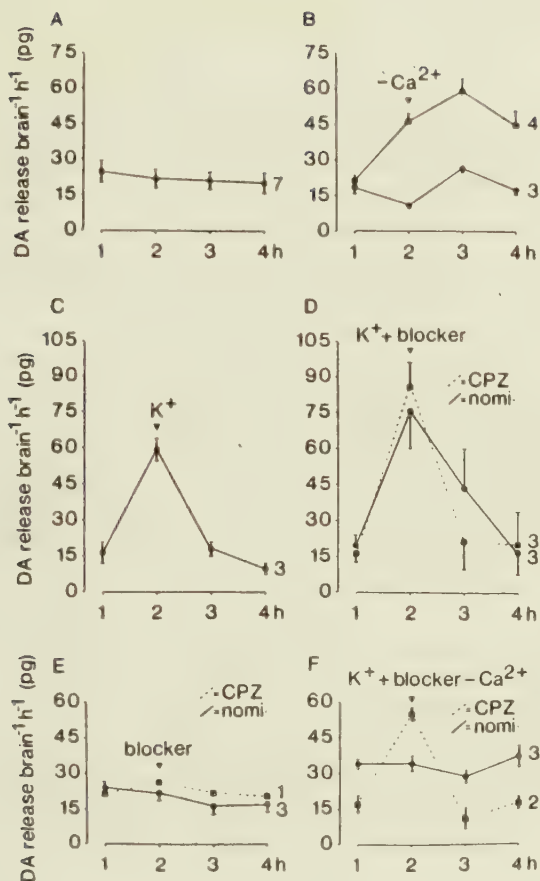


Abb. 9) Dopaminfreisetzung aus einzelnen Schneckenganglien unter verschiedenen Bedingungen. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung gezeichnet, die Anzahl der Experimente ist jeweils am rechten Ende des Graphen angegeben. (A) zeigt die basale Freisetzung von Dopamin. Die weiteren Teile zeigen die Effekte von Ca^{2+} -freiem Ringer (B), hoher K^+ -Konzentration (C), hoher K^+ -Konzentration plus Blocker der Dopaminaufnahme 10^{-5} M (D) nur Blocker 10^{-5} M (E) und hohe K^+ -Konzentration in Ca^{2+} -freiem Ringer plus 10^{-5} M Blocker (F) während der 2. Stunde Inkubation (CPZ = Chlorpromazin; nomi = Nomifensin).

DISKUSSION

1. Praktische Verwertbarkeit der Aminosäureanalyse mit DABS-Cl- bzw. OPA-Derivatisierung

Leider gibt es in der Literatur sehr wenige Veröffentlichungen, die sich vergleichend mit den Vor- und Nachteilen der einzelnen Methoden auseinandersetzen und vor allem die Detailprobleme ansprechen wie z.B. die apparative Ausstattung oder die Verwendung von Standards im Vergleich mit physiologischen Medien. Am ehesten sind in dieser Richtung noch Informationen von den Herstellern zu erhalten (Benson & Poulson, 1985; Schneider et al., 1986), wobei diese Informationen häufig nicht ganz objektiv sind, da sie die Tendenz haben, die Vorteile der vertriebenen Methode und die Nachteile anderer Methoden jeweils zu betonen.

Die DABS-Cl Methode wird z.T. als nicht empfehlenswert für quantitative Messungen bezeichnet (Schneider et al., 1986) oder nur eingeschränkt empfehlenswert unter "bestimmten Bedingungen" (Henschen & Lottspeich, 1985). Bisher hat anscheinend jedoch noch kein Autor die Abhängigkeit der DABS-Cl Reaktion von der Salzkonzentration festgestellt, was die quantitative Analyse mit dieser Methode weiter limitiert. Die Anwendung dieser Methode auf qualitative Messungen ist jedoch unbestritten.

Die Derivatisierung mit OPA ist eine Methode, die für quantitative Messungen von Aminosäuren aus physiologischen Medien geeignet ist, doch auch bei ihr stellt die Reproduzierbarkeit ein Problem dar. Sie wird von verschiedenen Autoren recht unterschiedlich angegeben; so berichten Lindrod & Mopper (1974) von $\pm 0.5\%$ und Godel et al. (1985) von $\pm 1\%$ Reproduzierbarkeit. Andere Autoren, die ebenfalls von Hand derivatisierten, geben Werte von $\pm 7\%$ an (Mones & Gilligen, 1985) oder bezeichnen Werte von $\pm 10\%$ und darüber als üblich (Benson & Poulson, 1985). Auch bei automatisch

prozessierten Proben werden unterschiedliche Werte gefunden, so z.B. bei Hodkin et al. optimal ca. $\pm 1\%$ oder bei Schneider et al. (1986) $\pm 2.5-4.3\%$. Die in dieser Arbeit erzielte Präzision von durchschnittlich $\pm 8\%$ ist demnach akzeptierbar. Eine Verbesserung könnte unter Umständen möglich sein, wenn noch genauere Derivatisierungszeiten und -temperaturen erarbeitet würden. Die Wichtigkeit dieser Parameter wird bei Schneider et al. (1986) erwähnt, taucht in früheren Arbeiten jedoch nicht auf.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß bei der Derivatisierung mit OPA ein Maximum der Fluoreszenzausbeute existiert. Bei Analysen von biologischem Material muß also darauf geachtet werden, daß das molare Verhältnis von OPA zu Aminosäuren sich im linearen Bereich bewegt. Ob ein Maximum auch bei Verwendung anderer Reagentien und/oder Reaktionsbedingungen existiert, ist nicht bekannt und sollte vor deren Anwendung auf jeden Fall untersucht werden.

Essentiell für die Genauigkeit ist korrektes Pipettieren der Reagentien. Bei dieser Methode werden nacheinander konzentrierte Puffer und Lösungsmittel pipettiert, die ein sehr unterschiedliches Benetzungs- und Fließverhalten zeigen, und das zusätzlich in den verwendeten Plastik-Spitzen von Spitze zu Spitze verschieden ausfallen kann. Daher können sich hier sehr leicht Fehler einschleichen, die eventuell zu den Tagesvariationen der Genauigkeit beitragen.

Verbesserungen bei der Probenaufbereitung können jedoch nicht eine optimale Apparatur ersetzen. Präzise Analysen, speziell im unteren pMol-Bereich, sind nur mit einem Detektionssystem möglich, bei dem Exzitations- und Emissionswellenlängen gut getrennt sind und das kein so starkes Rauschen hat wie die hier verwendete Anlage. Werden die oben genannten Fehlermöglichkeiten bei der Probenaufbereitung vermieden, ist eine routinemäßige Analyse von Aminosäuren ab dem mittleren pMol-Bereich auch mit nicht speziell dafür vorgesehenen Apparaturen möglich.

Seit dem Abschluß der Aminosäureanalysen im Rahmen dieser Arbeit sind zwei weitere Methoden publiziert worden. In Verbindung mit einer neuen chromatographischen Technik (micro-bore-

Säulen) ermöglichen sie, in einen Bereich noch höherer Empfindlichkeit (fMol) vorzustoßen. Zum einen ist das die Derivatisierung mit 9-Fluoenyl-methyloxycarbonyl (FMOC), die den Vorteil hat, mit primären und sekundären Aminen (z.B. Prolin) zu reagieren; die Reaktionsprodukte sind stabil und zeigen eine sehr hohe Fluoreszenzausbeute (Einarsson et al., 1983). Die zweite Methode, mit der ebenfalls im fMol-Bereich gemessen werden kann, ist die Derivatisierung mit Phenylhydantoin (PTH) und microbore-Chromatographie (Cunico et al., 1984). Diese Methoden haben zwar den Vorteil der hohen Empfindlichkeit, aber den Nachteil, daß sie hohe Ansprüche an die apparative Ausstattung stellen.

2. Zu den Katecholaminen im zirkumoesophagalen Ganglion von Planorbis und deren Freisetzung.

Dopamin ist das im Nervensystem von Mollusken überwiegende Katecholamin (Gospe, 1983, S.-Rozza, 1984). Die von uns gefundene Konzentration von $11.93 \pm 0.32 \text{ ug g}^{-1}$ Naßgewicht ist vergleichbar mit dem von Kerkut & Marschden (1970) mit Spectrofluorometrie gefundenen Wert von 9.53 ug g^{-1} . In den Ganglien anderer Gastropoden wurden mit verschiedenen Methoden ebenfalls Konzentrationen in dieser Größenordnung gefunden (Chiang et al., 1974; Osborne, 1984; Straub & Kulmann, 1984, Welsh, 1972).

Die Identifizierung von Noradrenalin im Schneckenganglion bestätigt die Ergebnisse früherer Arbeiten, daß dieses Katecholamin im ZNS von Mollusken vorliegt (Osborne & Cottrell, 1970; Juorio & Killick, 1972). In der Größenordnung ist die gefundene Menge vergleichbar mit dem Gehalt im Suboesophagalganglion von *Helix pomatia* (Osborne, 1984).

Adrenalin, von dem angenommen wurde, daß es in den Ganglien nicht vorkame, konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtung von Osborne (1984).

Jahreszeitliche Schwankungen des Monoamingehaltes im Nervensystem von Mollusken wurden bereits beschrieben für Serotonin in Ganglien von *Helix pomatia* (Hiripi & Salanki, 1973) und für

Dopamin bei *Mytilus edulis* (Stefano & Captane, 1977). Hierzu konnte gezeigt werden, daß bei *Planorbis* Dopamin, aber zusätzlich auch Noradrenalin, jahreszeitlichen Schwankungen unterliegt. Die Freisetzung dieser Substanz unter dem Einfluß von erhöhter K^+ -Konzentration ist ein Hinweis, daß sie bei Mollusken eine Transmitterfunktion haben könnte.

Die basale Freisetzung von Dopamin aus zirkumoesophagalen Ganglien betrug 24.5 ± 3.06 pg pro Ganglion und Stunde. Die Frage war nun, ob es sich dabei um eine synaptische Freisetzung oder um eine Diffusion aus dem (verletzten) Gewebe handelt. Ca^{2+} -freier Ringer führte bei einigen Ganglien zu einer Verminderung, wie es bei einer spontanen synaptischen Freisetzung zu erwarten wäre, bei anderen führte er jedoch zu einer Erhöhung, die sogar anhielt, wenn das Ganglion bereits wieder in Standard-Ringer überführt worden war. Der Grund für diese Reaktion blieb unbekannt; ein Zusammenhang mit den Versuchsbedingungen erscheint so gut wie ausgeschlossen.

Die Freisetzung von Dopamin ins Medium wurde durch hohe K^+ -Konzentrationen vergrößert. Dies deutet auf eine synaptische Freisetzung dieses Transmitters hin, da bekannt ist, daß erhöhte K^+ -Konzentrationen eine synaptische Freisetzung von Dopamin hervorrufen. Zusätzlich weiß man, daß sie die Wiederaufnahme von Katecholaminen hemmen (Anning et al., 1980; Bönisch et al., 1985). Die Versuche mit Aufnahmeblockern zeigten weiterhin, daß diese die freigesetzte Menge an Dopamin noch zu erhöhen vermochten. Auch die Abhängigkeit dieser Erhöhung bei Nomifensin von der Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen im Medium spricht für eine synaptische Freisetzung. Bei der Verwendung von Chlorpromazin wurde jedoch ohne Calcium eine signifikante Menge Dopamin freigesetzt. Der Wirkungsmechanismus dieser Substanz auf das Schneckenganglion ist nicht geklärt, jedoch ist bei anderen Zellen bekannt, daß sie mit einer Reihe von intrazellulären Prozessen interferieren kann (Prozialeck & Weiss, 1982). Es kann also angenommen werden, daß Dopamin bei den Ganglien, zumindest hauptsächlich, synaptisch freigesetzt wurde.

Der Versuch die Freisetzung von Dopamin aus einem einzelnen

GDC-Neuron nach elektrischer Stimulierung zu messen, schlug leider fehl. Dies spricht jedoch nicht dagegen, daß dieses spezielle Neuron dopaminerg ist (Berry & Pentreath, 1978), wenn man bedenkt, daß die chemische Stimulierung des gesamten Ganglions, das mehr als 30 dopaminerge Neurone enthält (Marschen & Kerkut, 1970) maximal 119 pg Dopamin freizusetzen vermag (d.h. weniger als 0.5% des gesamten Gehalts). Die freigesetzte Menge mag also wohl unter der Nachweisgrenze des Analysensystems liegen.

Z U S A M M E N F A S S U N G

- 1) Aminosäureanalysen mit DABS-Cl-Derivatisierung und HPLC-Auftrennung wurden durchgeführt und sehr starke Schwankungen der Reproduzierbarkeit festgestellt. Es wurde eine Abhängigkeit der Derivatisierung von der Salzkonzentration beobachtet, wobei ab ca. 1.5 M keine reproduzierbaren Chromatogramme mehr möglich sind.
- 2) Eine Trennung von Aminosäuren und Salzen wurde mit einigen kommerziellen Systemen versucht. Eine quantitative Rückgewinnung von pMol-Mengen war jedoch nicht möglich; über Molekularsiebgele wurde eine partielle Trennung erreicht. Versuche zur Reinigung des DABS-Cl erbrachten, daß Verunreinigungen, die die Analyse stören, sehr wahrscheinlich bei der Derivatisierungsreaktion entstehen.
- 3) Aminosäureanalysen im pMol-Bereich aus physiologischen Medien wurden mittels OPA-Derivatisierung und HPLC-Auftrennung durchgeführt. Die Reproduzierbarkeit lag bei durchschnittlich $\pm 8\%$. Ein Maximum der Fluoreszenzausbeute bei der Derivatisierung wurde bei einem molaren Verhältnis von 50:1 (OPA:Aminosäuren) gefunden.
- 4) Analysen von Katecholaminen mittels HPLC und ECD bis in den sub-pMol Bereich wurden erreicht, die Analysezeit konnte auf 10 Minuten reduziert werden.
- 5) Der Gehalt an biogenen Aminen im zirkumoesophagalen Ganglion der Schnecke Planorbis corneus wurde bestimmt und dabei Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin sowie zwei unbekannte Substanzen gefunden. Der Gehalt unterlag jahreszeitlichen Schwankungen.

- 6) Präparierte Ganglien setzen Dopamin ins Medium frei. Dies scheint eine synaptische Freisetzung zu sein, denn hohe K^+ -Konzentrationen erhöhen sie, Blocker der Wiederaufnahme von Dopamin können sie weiter erhöhen, jedoch nur in der Anwesenheit von erhöhtem Kalium. Die Freisetzung von Dopamin bei erhöhter K^+ -Konzentration in Ca^{2+} -freiem Medium steigt mit Nomifensin nicht über die basale Freisetzung, wohl aber mit Chlorpromazin.

L I T E R A T U R

- Anning, E.N.; O'Donnell, S.R. & Wanstall, J.C. (1980) K⁺-depolarization: an alternative method of inhibiting extraneuronal uptake on isolated tissue preparations. Arch. Int. Pharmacodyn. 243:209-216.
- Anton, A.M. & Sayre, D.F. (1962) A study of the factors affecting the aluminium oxide trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines. J. Pharm. Exp. Ther. 138:360-375.
- Barber A. (1985) Actions of acetylcholine on the salivary gland cells of the pond snail, *Planorbis corneus*. Comp. Biochem. Pysiol. 80C:175-184.
- Benson, J.R. & Poulson, B. (1985) Amino Acid Analysis in 20 Minutes. Interaction (Fa. ict)
- Berry, M.S. & Pentreath, V.W. (1978) The characterized dopamine neuron in *Planorbis corneus*. In: Biochemistry in characterized neurons (Osborne, N.N. ed.) Pergamon Press, Oxford, p.81-115.
- Bönisch, H.; Bryan, L.T.; Henseling, M.; O'Donnell, S.R.; Stockmann, P. & Trendelenburg, U. (1985) The effect of various ions on uptake of catecholamines. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac. 328:407-416
- Chang, J.-Y.; Knecht, R. & Braun, D.G. (1981) Amino acid analysis at the picomole level. Biochem. J. 199:547-555.
- Chang, J.-Y.; Martin, P.; Bernasconi, R. & Braun, G.B. (1981) High-sensitivity amino acid analysis: measurement of amino acid neurotransmitter in mouse brain. FEBS-Letters 132:117-121.

- Chiang, P.K.; Bourgeois, J.G. & Bueding, E. (1974) 5-Hydroxytryptamin and dopamine in *Biomphalaria glabrata*. J. Parasitol. 60:264-271.
- Corradetti, R.; Moneti, G.; Moroni, F.; Pepeu, G. & Wieraszko, A. (1983) Electrical stimulation of the striatum radiatum increases the release and neosynthesis of aspartate, glutamate and γ -aminobutyric acid in rat hippocampal slices. J. Neurochem. 41:1518-1525.
- Cunico, R.L.; Simpson, R.; Correia, L. & Wehr, C.T. (1984) High-sensitivity phenylthiohydantoin amino acid analysis using conventional and micro-bore chromatography. J. Chromat. 336:105-113.
- Einarsson, S.; Josefsson, B. & Lagerkvist, S. (1983) Determination of amino acids with 9-Fluoenylchloroformat and reversed phase high performance liquid chromatography. J. Chromat. 282:609-618.
- Ferkany, J.W. & Coyle, J. (1983) Evoked release of aspartate and glutamate: disparities between prelabelling and direct measurement. Brain Research 278:279-282.
- Fonnum, F. & Henke, H. (1982) The topographical distribution of alanine, aspartate, γ -aminobutyric acid, glutamate, glutamine and glycine in the pigeon tectum and the effect of retinal ablation. J. Neurochem. 38:1130-1134.
- Geddes, J.W. & Wood, J.D. (1984) Changes in the amino acid content of nerve endings (synaptosomes) induced by drugs that alter the metabolism of glutamate and γ -aminobutyric acid. J. Neurochem. 42:16-23.
- Godel, H.; Graser, T.; Földi, P.; Pfauder, P. & Fürst, P. (1984) Measurement of free amino acids in human biological fluids by

HPLC. J.Chromat. 297:49-61.

Gospe, S.M. (1983) Studies of dopamine pharmacology in molluscs. Life Sci. 33:20

Hill, J.W.; Walter, F.H.; Wilson, T.D. & Stuart, J.D. (1979) High performance liquid chromatographic determination of amino acids in the picomole range. Anal. Chem. 51:1338-1341.

Hiripi, L. & Salanki, J. (1973) Seasonal and activity dependent changes of serotonin level in CNS and heart of snail (*Helix pomatia*). Comp. Gen. Pharmacol. 4:285-292.

Hiripi, L.; Burrell, D.E.; Brown, M.; Assanah, P.; Stanec, A. & Stefano, G.B. (1982) Analysis of the monoamine accumulations in the neuronal tissues of *Mytilus edulis* and *Anodonta cygna* (*Bivalvia*) - III Temperature and seasonal influences. Comp. Biochem. Physiol. 71C:209-213.

Hodgin, J.C.; Howard, P.Y. & Ball, D.M. (1983) An automated device for in situ pre-column derivatization and integration of amino acids for HPLC analysis. J. Chrom. Sci. 21:503-507.

Horvath, C.; Melander, W. & Molnar, J. (1976) Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. J. Chromat. 125:129-159.

Israel, M. & Lesbats, B. (1981) Chemoluminescent determination of acetylcholine and continuous detection of its release from torpedo electric organ synapses and synaptosomes. Neurochem. Int. 3:81-90.

Israel, M. & Lesbats, B. (1982) Application to mammalian tissues of the chemoluminescent method for detecting acetylcholine. J. Neurochem. 39:248-250.

- Jones, B.N. & Gilligan, J.P. (1983) Amino acid analysis by o-phthalaldehyde precolumn derivatization and reversed phase HPLC. *Am. Biotech. Lab.* 12:46-51.
- Juorio, A.V. & Killick, S.W. (1972) Monoamines and their metabolism in some molluscs. *Comp. Gen. Pharmacol.* 3:283-295.
- Karger, B.L.; Grant, R.J.; Hartkopf, A. & Weiner, P.H. (1976) Hydrophobic effects in reversed phase liquid chromatography. *J. Chromat.* 128:65-78.
- Kissinger, P.T.; Felice, L.J.; Rigglin, R.M.; Pachla, L.A. & Wenke, D.C. (1974) Electrochemical detection of selected organic components in the eluate from high-performance liquid chromatography. *Clin. Chem.* 20:992-997.
- Kissinger, P.T.; Rigglin, R.M.; Alcorn, R.L. & Rau, L.D. (1975) Estimation of catecholamines in urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Biochem. Med.* 13:299-306.
- Knox, J.H. & Jurand, J. (1976) Separation of catecholamines and their metabolites by adsorption, ion-pair and soap chromatography. *J. Chromat.* 125:89-101.
- Lammens, J. & Verzele, M. (1978) Rapid and easy HPLC analysis of amino acids. *Chromatographia* 11:376-378.
- Liebzeit, G. & Dawson, R. (1981) Isoindole derivatives of amino acids for HPLC separations - effect of reaction pH and time on fluorescence yield. *J. HRC & CC* 4:354-356.
- Lin, J.-K. & Chang, J.-Y. (1975) Chromophoric labelling of amino acids with 4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride. *Anal. Chem.* 47:1634-1638.

- Lindroth, P. & Mopper, K. (1979) High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Chem.* 51:1667-1674.
- Lottspeich, F. & Henschen, A. (1985) Amino acids, peptides, proteins. In: *HPLC in Biochemistry* (Henschen, A.; Hupe, K.F.; Lottspeich, F. & Volter, W. eds.) Verl. Chemie, Weinheim p.139-216.
- Marschden, C. & Kerkut, G.A. (1970) The occurrence of monoamines in *Planorbis corneus*: a fluorescence microscopic and microspectrometric study. *Comp. Gen. Pharmacol.* 1:101-116.
- Mefford, I.N. (1981) Application of HPLC with ECD to neurochemical analysis: Measurement of catecholamines, serotonin and metabolites in rat brain. *J. Neurosci. Meth.* 3:207-224.
- Molnar, J. & Horvath, C. (1976) Reversed-phase chromatography of polar biological substances: separation of catechol compounds by high performance liquid chromatography. *Clin. Chem.* 22:1497-1502.
- Molnar, J. & Horvath, C. (1977) Separation of amino acids and peptides on nonpolar stationary phases by high performance liquid chromatography. *J. Chromat.* 142:623-640.
- Müller, T.H. & Unsicker, K. (1981) High-performance liquid chromatography with electrochemical detection as a highly efficient tool for studying catecholaminergic systems. I Quantitation of noradrenaline, adrenaline and dopamine in cultured adrenal medullary cells. *J. Neurosci. Meth.* 4:39-52.
- Nadler, J.V.; White, W.F.; Vaca, K.W.; Redburn, D.A. & Cotman, C.W. (1977) Characterization of putative amino acid transmitter release from slices of rat dentate gyrus. *J. Neurochem.*

- Nitsch, C. & Okada, Y. (1979) Distribution of glutamate in the layers of the rabbit hippocampal fields CA 1, CA 3 and the dentate area. *J. Neurosci. Res.* 4:161-167.
- Oja, S.S.; Korpi, E.R. & Kontro, N. (1981) Potassium-stimulated release of taurin, hypotaurin and GABA from brain tissue in vitro. In: *Amino Acid Neurotransmitters* (DeFeudis, F.V. & Mandel, P., eds.) Raven Press, N.Y., p. 175-181.
- Osborne, N.N. (1984) Phenylethanolamine-N-methyltransferase and dopamine- β -hydroxylase immunoreactivity and the occurrence of noradrenaline and adrenaline in the nervous system of the snail *Helix pomatia*. *Cell. Tiss. Res.* 237:605-608.
- Osborne, N.N. & Cottrell, G.A. (1970) Occurrence of noradrenaline and metabolites of primary catecholamines in the brain and heart of *Helix*. *Comp. Gen. Pharmacol.* 1:1-10.
- Osborne, N.N.; Hiripi, L. & Neuhoff, V. (1975) The in vitro uptake of biogenic amines by snail (*Helix pomatia*) nervous tissue. *Biochem. Pharmac.* 24:2141-2148.
- Pfeifer, R.; Karol, R.; Korpi, J.; Bourgoyne, R. & McCourt, D. (1983) Practical application of HPLC to amino acid analysis. *Am. Lab.* March:77-84.
- Prozialeck, W.C. & Weiss, P. (1982) Inhibition of calmodulin by phenothiazines and related drugs: structure-activity relationships. *J. Pharm. exp. Ther.* 222:509-516.
- van Rooijten, H.W. & Poppe, H. (1983) Noise and drift phenomena in amperometric and coulometric detectors for HPLC and FIA. *J. liq. Chrom.* 6:2231-2254.

- Ross, M.S.F. (1977) Pre-column derivatization in high-performance liquid chromatography. *J. Chromat.* 141:107-119.
- Roth, M. (1971) Fluorescence reaction for amino acids. *Anal. Chem.* 43:880-882.
- S.-Rozza, K. (1984) The pharmacology of molluscan neurons. *Progr. in Neurobiol.* 23:79-150.
- Satchell, D.G. & Twarog, G.M. (1979) Identification and estimation of dopamine released from the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus californicus* in response to nerve stimulation. *Comp. Biochem. Physiol.* 64C:231-235.
- Schneider, H.-J.; Hoepker, H.-R. & Földi, P. (1986) Pre-column-Derivatisierung von Aminosäuren mit OPA, FMOC und PITC. GIT (in press)
- Snyder, L.R. (1974) Classification of the solvent properties of common liquids. *J. Chromat.* 92:223-230.
- Spackman, D.H.; Stein, W.H. & Moore, S. (1958) Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30:1190-1205.
- Stefano, G.B. & Catapane, E.J. (1977) Seasonal monoamine changes in the central nervous system of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Experientia* 33:1341-1342.
- Straub, H. & Kuhlmann, D. (1984) Identification and quantitative measurements of biogenic amines in the central nervous tissue of some gastropods. *Comp. Biochem. Physiol.* 78:319-323.
- Surmann, P. (1983) Elektrochemische Detektion in der HPLC. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 316:373-381.

- Tapuhi, Y.; Schmdt, D.E.; Lindner, W. & Karger, B.L. (1981) Dansylation of amino acids for high-performance liquid chromatography analysis. *Anal. Biochem.* 115:123-129.
- Taxt, T. & Storm-Mathisen, J. (1984) Uptake of D-aspartate and L-glutamate in excitatory axon terminals in hippocampus: Autoradiographic and biochemical comparison with γ -aminobutyrate and other amino acids in normal rats and in rats with lesions. *Neurosci.* 11:79-100.
- Tuomisto, T. (1977) Nomifensine and its derivatives as possible tools for studying amine uptake. *Eur. J. Pharm.* 42:101-106
- Wilson, M.W. & Carr, P.W. (1979) Simplex algorithm for the optimization of gradient elution in high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* 51:1835-1840.
- Welsh, J.H. (1972) Catecholamines in invertebrates. In: *Hb. of exp. Pharmacology* (Blaschko, H. & Muscholl, E., eds.) 33:79-109.
- Westerink, B.H.C. (1983) Analysis of trace amounts of catecholamines and related compounds in brain tissue: A study near the detection limit of liquid chromatography with electrochemical detection. *J. liq. Chrom.* 6:2337-2351.
- Wold, F. (1981) In vivo chemical modification of proteins (post-translational modification). *An. Rev. Biochem.* 50:783-814.
- Zanetta, J.P.; Vincendon, G.; Mandel, P. & Gombos, G. (1970) The utilisation of 1-dimethylaminonaphtalene-5-sulphonyl chlorid for quantitative determination of free amino acids and partial analysis of primary structure of proteins. *J. Chromat.* 51:441-458.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. G. ten Bruggencate für die Überlassung des Themas und seine Geduld angesichts der zahlreichen Rückschläge, die im Laufe der Methodenentwicklung aufgetreten sind.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. A. Barber für wertvolle Anregungen und die unermüdliche Hilfe beim Arbeiten mit Schneckenganglien. Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. M. Ackenheil und Herrn Prof. N. Matussek, in deren Labor ich arbeiten durfte und bei Frau D. Welter, die mich in die Technik der Katecholaminanalyse eingeführt hat und bei Frau H. Hippus für die technische Assistenz bei diesen Versuchen.

Danken möchte ich auch Herrn R. Wörndl und Frau K. Kubitzek für die technische Assistenz bei den Aminosäureanalysen.

Herrn Hofmann danke ich für die fotografische Reproduktion der Abbildungen und Frau Schindler für die teilweise Niederschrift der Arbeit.

LEBENS LAUF

Vor- und Familienname:	Bernhard Michael Kempter
Geburtstag und -ort:	28. Juli 1952, Augsburg
Eltern:	Dr. Kaspar Kempter, Dipl. Volkswirt Margarethe Kempter, geb. Kühbauch
1958 - 1963	Besuch der Volksschule in Augsburg
1963 - 1972	Besuch des Peutinger - Gymnasiums (neusprachlich) in Augsburg
Juni 1972	Abitur
1972 - 1973	Studium der Fächer Physik und Chemie an der Universität München
1973 - 1976	Studium der Fächer Biologie und Chemie an der TU München
1976	Wechsel an die Universität München
1978	Hauptdiplomprüfung für Biologie (Fächer: Physiologie, Genetik, Biochemie) Studium der Medizin an der Universität München
Juni 1979	Diplomarbeit bei Prof. B. Linzen
1979 - 1983	Abschluß als Dipl. Biol. Doktorarbeit am Lehrstuhl Prof. Linzen am Zoologischen Institut der Universität München
Mai - Juli 1983	Studentische Hilfskraft am Zoologischen Institut der TU München
Aug. 1983 - April 1985	Wissenschtl. Hilfskraft am Physiologi- schen Institut der Universität München, Lehrstuhl Prof. G. ten Bruggencate
Feb. 1984	Promotion zum Dr. rer. nat.
April 1985	3. Staatsexamen in Medizin
Mai 1985	Approbation Ernennung zum Akademischen Ratauf Zeit am Lehrstuhl Prof. G. ten Bruggencate

